RNA干扰介导*HvIAP5*基因沉默对茄二十八星瓢虫存活和发育的影响

周楚翘[1] 阮雅琳[1] 杨春晓[1] 张友军[2] 潘慧鹏[1*]

（1. 华南农业大学植物保护学院，绿色农药全国重点实验室，生物防治教育部工程研究中心，广州 510642；
2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所，蔬菜生物育种全国重点实验室，北京 100081）

摘要：为评估凋亡抑制蛋白5（inhibitor of apoptosis protein 5，IAP5）编码基因作为高效防控靶标基因的潜力，以茄二十八星瓢虫*Henosepilachna vigintioctopunctata*为研究对象，系统测定*HvIAP5*基因在茄二十八星瓢虫中的时空表达模式及组织特异性，通过饲喂体外合成和菌液表达产生的ds*HvIAP5*探讨*HvIAP5*沉默对茄二十八星瓢虫的存活率、生长发育及细胞凋亡的影响。结果显示：在茄二十八星瓢虫各发育阶段和各组织中*HvIAP5*基因均有广泛表达，主要在4龄幼虫阶段和中肠组织中高表达，成虫和马氏管中相对表达量则较少。饲喂体外合成的ds*HvIAP5*后，茄二十八星瓢虫的存活率较对照显著降低，其中饲喂浓度为100、200和300 ng/μL的ds*HvIAP5*浸泡叶片2 d后，1龄幼虫的存活率分别为64.0%、30.0%和12.0%；单头饲喂100、200和500 ng的ds*HvIAP5*后，4龄幼虫的存活率分别为58.0%、32.0%和2.0%，且取食ds*HvIAP5* 200 ng后2 d，*HvIAP5*基因的表达量显著下降了90.8%。饲喂菌液表达产生的ds*HvIAP5*后，茄二十八星瓢虫1龄和4龄幼虫的存活率分别达到10.0%和4.0%。TUNEL染色结果显示摄食ds*HvIAP5*显著促进了茄二十八星瓢虫幼虫中肠组织的细胞凋亡。综上所述，*HvIAP5*是潜在的RNA干扰高效靶标基因。

关键词：茄二十八星瓢虫；凋亡抑制蛋白；饲喂法；RNA干扰；细胞凋亡

RNA interference-mediated silencing of *HvIAP5* impairs survival and development of the 28-spotted ladybeetle *Henosepilachna vigintioctopunctata*

Zhou Chuqiao[1] Ruan Yalin[1] Yang Chunxiao[1] Zhang Youjun[2] Pan Huipeng[1*]

（1. Engineering Research Center of Biological Control, Ministry of Education; State Key Laboratory of Green Pesticide; College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China;
2. State Key Laboratory of Vegetable Biobreeding, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China）

Abstract: To evaluate the potential of the inhibitor of apoptosis protein 5 (*HvIAP5*) as an efficient RNA interference (RNAi) target gene for pest management, its temporal and spatial expression patterns and tissue specificity in 28-spotted ladybeetle *Henosepilachna vigintioctopunctata* were investigated. The effects of *HvIAP5* silencing on survival, development and apoptosis were evaluated using double-stranded RNA (ds*HvIAP5*) synthesized *in vitro* and expressed in bacteria. *HvIAP5* was broadly expressed across all developmental stages and tissues, with the highest expression observed in the 4th-instar larvae and midgut, and lower levels in adults and Malpighian tubules. Feeding *in vitro*-synthesized ds*HvIAP5* significantly reduced survival: after two days of exposure to 100, 200, and 300 ng/μL

基金项目：国家重点研发计划（2023YFD1700700）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：panhuipeng@scau.edu.cn

收稿日期：2025-02-24

ds*HvIAP5*, survival rates 1st-instar larvae were 64.0%, 30.0% and 12.0%, respectively; 4th-instar larvae receiving 100, 200, and 500 ng per individual showed survival rates of 58.0%, 32.0%, and 2.0%, respectively, with a 90.8% reduction in *HvIAP5* expression after two days of fed with 200 ng ds*HvIAP5*. Feeding bacterial-expressed ds*HvIAP5* resulted in survival rates of 10.0% and 4.0% for 1st- and 4th-instar larvae, respectively. TUNEL staining indicated that ds*HvIAP5* feeding significantly promoted apoptosis in midgut tissues. These findings suggest that *HvIAP5* is a promising RNAi target gene for the control of *H. vigintioctopunctata*.

Key words: *Henosepilachna vigintioctopunctata*; inhibitor of apoptosis protein; feeding assay; RNA interference; apoptosis

茄二十八星瓢虫 *Henosepilachna vigintioctopunctata* 属于鞘翅目瓢虫科，主要分布在亚洲，主要为害茄子 *Solanum melongena*、马铃薯 *S. tuberosum* 等茄科作物（王在凌，2019）。目前，防治茄二十八星瓢虫主要依靠化学杀虫剂。随着我国对农药使用量提出“负增长”的政策要求后，传统的单一化学防治模式已不能满足农业可持续发展的需求。因此，寻求绿色高效的防治方法来防控茄二十八星瓢虫迫在眉睫。

RNA干扰技术（RNA interference，RNAi）是一种转录后基因沉默机制，通过导入与内源靶标基因序列同源的双链RNA（double-stranded RNA，dsRNA）介导同源信使RNA的降解，进而引起目标基因特异性的沉默（Fire et al.，1998），从而显著破坏害虫的生理稳态，最终导致其生长发育受阻和生殖能力下降（张建珍等，2021）。dsRNA在生物体内普遍存在，在自然环境中易降解，且具有无毒、无残留的特点，作为绿色环保型的杀虫技术具有极大的潜力。目前利用RNAi技术防治农业害虫的报道较多。例如，ds*ApAK*处理后，豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 死亡率最高可达91.1%（宗诗轩等，2023）；经大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达合成的ds*ACT*处理后，87%的马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 个体死亡（何弯弯等，2019）。目前关于利用RNAi技术防治茄二十八星瓢虫的研究未见报道，但关于茄二十八星瓢虫的基因功能研究取得了显著进展。例如，几丁质脱乙酰酶基因 *HvCDA1* 对茄二十八星瓢虫的存活与发育有关键调控作用，干扰 *HvCDA1* 表达可导致其蜕皮异常，化蛹受阻及羽化失败，最终导致其死亡（王亚洁等，2023）；饲喂低浓度ds*HvFTZ-F1*后，65.0%的茄二十八星瓢虫1龄幼虫因蜕皮受阻而死亡，同时沉默 *HvFTZ-F1* 后茄二十八星瓢虫体内20E相关基因 *HvDIB*、*HvSPOOK*、*HvSHADOW*、*HvSHADE* 和 *HvE75* 的表达水平降低（王亚洁等，2022）；这些研究为开发防治茄二十八星瓢虫的RNAi新型生物农药提供了潜在的致死性靶标基因。

细胞凋亡是一种由基因调控的程序性细胞死亡过程（Kerr et al.，1972）。与细胞坏死不同，细胞凋亡是一种有序且主动的细胞自我毁灭机制，不会引发生物体的炎症反应，并在维持生物体的正常发育、组织稳态及调节免疫等方面发挥着重要作用（Srinivasula & Ashwell，2008）。细胞凋亡的调控涉及多种分子因子，包括Caspase家族、Bcl-2家族以及凋亡抑制蛋白（inhibitor of apoptosis protein，IAP）家族，这些因子通过复杂的信号通路精确调控细胞凋亡的发生和发展。IAP5作为IAP的重要成员包含6种不同亚型，这些亚型的亚细胞定位明显不同，主要分布在细胞核、细胞质及线粒体中，在有丝分裂期间对染色体运动有重要的调控作用（Vucic et al.，2000）。作为细胞凋亡的抑制因子，IAP5在细胞分裂和凋亡调控中占据着核心位置（Altieri，2003；Saleem et al.，2013；Albadari & Li，2023）。例如，沉默 *TcIAP5* 基因后赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 细胞增殖减少，幼虫发育缺陷，最终导致幼虫全部死亡（Yoon et al.，2020）；RNAi介导的 *HaIAP5* 沉默可诱导棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 细胞凋亡（He et al.，2012），而茄二十八星瓢虫中 *IAP5* 基因的功能尚不清楚。

为评估 *HvIAP5* 作为高效防控靶标基因的潜力，本研究以茄二十八星瓢虫为研究对象，系统测定 *HvIAP5* 基因在茄二十八星瓢虫中的时空表达模式及组织特异性，通过饲喂体外合成和菌液表达产生的ds*HvIAP5*探讨 *HvIAP5* 沉默对茄二十八星瓢虫的存活率、生长发育及细胞凋亡的影响，以期揭示ds*HvIAP5*对茄二十八星瓢虫的致死机制，为开发新型RNAi生物农药提供潜在靶标基因。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫和植物：2018年5月于华南农业大学校

园内自然生长的龙葵 *Solanum nigrum* 植株上采集茄二十八星瓢虫成虫，将其置于铺有滤纸、直径90 mm、高13 mm的培养皿中，滤纸通过棉球保持湿润，将培养皿置于温度（25±1）℃、光周期14 L∶10 D、相对湿度（80±5）%的人工气候培养箱中，用茄子叶片作为唯一营养源进行继代饲养，取各虫态供试。茄子品种为广东省广州市增城区主栽茄子品种农丰长茄，种子购自广东省农业科学院蔬菜研究所；于华南农业大学温室内进行规范化栽培管理，选取健康叶片饲喂试虫。

培养基：LB液体培养基成分为氯化钠10 g、胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g，蒸馏水定容至1 L，121 ℃高压蒸汽灭菌20 min；LB液体培养基中添加琼脂粉20 g即为LB固体培养基。

试剂和仪器：PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser、QuickCut™ *BamH* I 酶和QuickCut™ *Sac* I酶，日本TaKaRa公司；96孔板，美国Bio-Rad公司；DNA胶回收试剂盒、琼脂糖、2×PCR *Taq* MasterMix，生工生物工程（上海）股份有限公司；HiScribe™试剂盒，美国NEB公司；C116重组酶，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；GFP质粒、RNase III缺陷型大肠杆菌 *Escherichia coli* HT115（DE3）感受态细胞，上海碧云天生物技术有限公司；L4440质粒，上海纽普生物科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。RXZ-436E人工气候培养箱，宁波江南仪器厂；NanoDrop OneC分光光度计，美国Thermo Fisher Scientific公司；P250 Pannoramic扫描仪，匈牙利3D Histech公司；GBox Chemi XRQ电泳凝胶成像分体系统，美国Syngene公司；CFX96 Touch实时荧光定量PCR仪、iMARK-680型酶标仪，美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 试虫总RNA提取和cDNA第一链合成

茄二十八星瓢虫卵、1~4龄幼虫、蛹、雌成虫和雄成虫分别取20粒、10、7、5、2、1、1和1头，分别置于不含有RNase的1.5 mL离心管中，每组样品重复3次，用液氮迅速冷冻，置于−80 ℃冰箱中保存，备用。分别采集40头二十八星瓢虫4龄幼虫的表皮、脂肪体、前肠、中肠、后肠和马氏管，置于不含有RNase的1.5 mL离心管中，每组样品重复3次，用液氮迅速冷冻，置于−80 ℃冰箱中保存，备用。

采用TRIzol法分别提取不同发育阶段茄二十八星瓢虫样品和不同组织样品的总RNA，使用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA样品质量，使用分光光度计检测其浓度，所有样本的吸光度比值 $OD_{260\ nm}/OD_{230\ nm}$ 均介于1.8~2.2之间，则符合标准。每种样品各取1.0 μg总RNA，采用PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser反转录合成cDNA第一条链，将所得的cDNA溶液均以10倍的比例稀释，−20 ℃保存，备用。

1.2.2 *HvIAP5*基因在不同发育阶段和组织的表达模式

从茄二十八星瓢虫转录组数据中获得 *HvIAP5* 基因序列，利用IDT PrimerQuest™Tool网站设计荧光定量PCR特异性引物RT-qPCR-*HvIAP5*-F/RT-qPCR-*HvIAP5*-R（表1），引物均委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。以 *RPS18* 基因作为内参基因（Lü et al.，2018），利用设计的荧光定量PCR特异性引物对茄二十八星瓢虫不同生长发育阶段和不同组织中 *HvIAP5* 基因的相对表达量进行实时荧光定量PCR（real-time quantitative PCR，RT-qPCR）检测。50 μL RT-qPCR反应体系：cDNA模板2.5 μL、10 μmol/L的F和R引物各2.5 μL、TB Green 25 μL、ddH_2O 17.5 μL。将反应体系滴到96孔板，RT-qPCR反应程序：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s；60 ℃退火30 s，40个循环；熔解曲线：95 ℃ 5 s（4.4 ℃/s），60 ℃（2.2 ℃/s），95 ℃（0.11 ℃/s，每升高1 ℃采集1次荧光信号）。采用C1000 Real-Time PCR System进行数据读取与分析，应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目标基因的相对表达量进行计算（Livak & Schmittgen，2001）。

1.2.3 dsRNA的体外合成

基于茄二十八星瓢虫的转录组数据（GenBank登录号为PRJNA592380）进行生物信息学分析，获取 *HvIAP5* 基因的部分核苷酸序列。基于该序列，利用E-RNAi网站（https://e-rnai. dkfz. de/signaling/e-rnai3/）设计ds*HvIAP5*以及对照ds*GFP*的特异性引物（表1）。分别利用1.2.1合成的cDNA和GFP质粒，利用ds*HvIAP5*和ds*GFP*的特异性引物扩增带T7启动子的目标基因片段。100 μL PCR反应体系：2×PCR *Taq* MasterMix 50 μL、cDNA/GFP质粒5 μL、10 μmol/L F/R引物各5 μL、ddH_2O 35 μL。PCR反应程序：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，35个循环；72 ℃终延伸10 min。利用1%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测，并使用DNA胶回收试剂盒回收目标条带，作为体外合成dsRNA的模板。采用HiScribe™试剂盒合成dsRNA，用ddH_2O对其进行溶解，利用1.5%琼脂糖凝胶电泳对dsRNA质量进行检测，利用分光光度计检测dsRNA的浓度，将检测合格的dsRNA置于−80 ℃冰箱中保存，备用。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′−3′） Primer sequence（5′−3′）
RT-qPCR-*HvIAP5*	F: GGGTCAAGAATTGAACCAGA
	R: GCAAACTGGCAATGACTTG
RT-qPCR-*HvRPS18*	F: CGCAATCAAAGGTGTTGGAAG
	R: GCCTAGGGTTGGCCATAATAG
ds*HvIAP5*	F: taatacgactcactatagggGTGTAGTGCTCGAAAGATG
	R: taatacgactcactatagggCAACTTATTGTTGTGGTAATCC
ds*GFP*	F: taatacgactcactatagAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAG
	R: taatacgactcactatagTTCACGTTGATGCCGTTCTTC
L4440-ds*HvIAP5*	F: atcatcgatgaattcGTGTAGTGCTCGAAAGATG
	R: ttcctgcagcccgggCAACTTATTGTTGTGGTAATCC
L4440-ds*GFP*	F: atcatcgatgaattcAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAG
	R: ttcctgcagcccgggTTCACGTTGATGCCGTTCTTC

下划线表示T7启动子。Underlined sequences are T7 promoters.

1.2.4 饲喂体外合成的ds*HvIAP5*对幼虫发育的影响

本研究测定体外合成的ds*HvIAP5*分别对茄二十八星瓢虫1龄和4龄幼虫生长发育的影响。

选取同日龄茄二十八星瓢虫1龄幼虫10头（1个生物学重复），集中饲养于同一个铺有滤纸、直径60 mm、高13 mm的培养皿中，用湿棉球保湿；取直径为12 mm的圆形茄子叶片分别于浓度为100、200和300 ng/μL的ds*HvIAP5*溶液中浸泡2 min，以浓度为300 ng/μL的ds*GFP*中浸泡为对照，取出后置于培养皿中，每皿1片叶片，将培养皿置于温度（25±1）℃、光周期14 L∶10 D、相对湿度（80±5）%的人工气候箱中饲养，每个处理5个重复，每天更换1次叶片，连续饲喂2 d后改喂未浸泡处理的茄子叶片，每天更换新鲜的叶片。从饲喂dsRNA的第1天开始，每天统计各培养皿中试虫的死亡数量，计算存活率，同时观察并记录存活试虫的生长发育情况，持续观察10 d。

选取同日龄茄二十八星瓢虫4龄幼虫，饥饿处理24 h后置于铺有滤纸、直径30 mm、高13 mm的培养皿中，每皿1头（1个生物学重复），用湿棉球保湿；分别饲喂1 μL浓度为100、200、500 ng/μL的ds*HvIAP5*，以饲喂1 μL浓度为500 ng/μL的ds*GFP*为对照，培养皿置于温度（25±1）℃、光周期14 L∶10 D、相对湿度（80±5）%的人工气候箱中饲养，饲喂dsRNA后立刻用未经处理的新鲜茄子叶片喂养试虫，每皿中放置1片直径为12 mm的叶片，每天更换新鲜的叶片，每个处理30个重复。每天统计各培养皿中试虫的死亡数量，计算存活率，同时观察并记录存活试虫的生长发育情况，持续观察10 d。

1.2.5 ds*HvIAP5*对*HvIAP5*基因干扰效果的测定

选用同日龄茄二十八星瓢虫4龄幼虫，饥饿处理24 h后置于铺有滤纸、直径30 mm、高13 mm的培养皿中，每皿1头即1个重复，用湿棉球保湿；分别饲喂1 μL浓度为200 ng/μL的ds*HvIAP5*和ds*GFP*，每个处理3个重复，将培养皿置于温度（25±1）℃、光周期14 L∶10 D、相对湿度（80±5）%的人工气候箱中饲养，处理2 d后取出试虫，用液氮速冻，于−80 ℃超低温冰箱保存。采用TRIzol法提取样品总RNA，按照1.2.1方法反转录后获得cDNA，采用RT-qPCR方法检测*HvIAP5*基因的表达水平，计算*HvIAP5*的相对表达量，方法同1.2.2。通过比较对照和处理的茄二十八星瓢虫中*HvIAP5*的相对表达量确定ds*HvIAP5*的干扰效率。

1.2.6 菌液表达产生的dsRNA

用双T7启动子修饰的L4440质粒作为表达dsRNA的载体。根据*HvIAP5*和*GFP*的基因序列，采用软件vazyme. com（https://crm. vazyme. com/cetool/singlefragment.html）分别设计特异性扩增引物L4440-ds*HvIAP5*-F/L4440-ds*HvIAP5*-R和L4440-ds*GFP*-F/L4440-ds*GFP*-R（表1），PCR反应程序和体系同1.2.3。采用QuickCut™ *Bam*H I和QuickCut™ *Sac* I酶对L4440载体进行双酶切反应，用DNA胶回收试剂盒对PCR扩增产物以及线性化的载体凝胶回收，纯化。采用同源重组的方法用C116重组酶将纯化后的L4440载体与目的基因片段进行体外连接重组。将构建好的重组质粒转入具有异丙基-*β*-D-硫代半乳糖苷（isopropyl *β*-D-1-thiogalactopyranoside，IPTG）诱导T7聚合酶活性的RNase III缺陷型大肠杆菌HT115（DE3）感受态细胞中。将转

化后的菌体涂布于LB固体培养基上，37 ℃过夜培养后挑选单菌落送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，选择测序正确的菌液进行扩大培养。取4 μL菌液接种至4 mL含有10 μg/mL四环素和10 μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中，于37 ℃、210 r/min条件下振荡培养12~14 h，取500 μL转接至50 mL含有相同浓度抗生素的LB液体培养基中，待菌液吸光度$OD_{600\,nm}$达到0.5~0.8时加入IPTG，使其终浓度为1 mmol/L，于37 ℃、120 r/min条件下振荡培养5 h诱导dsRNA表达。为检测dsRNA的诱导情况，以5 000 *g*离心10 min，收集诱导后菌体细胞，采用TRIzol法提取总RNA，用GoldView I染色的1.5%琼脂糖凝胶检测dsRNA条带。取表达dsRNA的菌液100 mL，于5 000 *g*、4 ℃条件下离心10 min，收集细胞，用无菌水悬浮后用于后续的RNAi试验。

1.2.7 *饲喂菌液表达的ds*HvIAP5*对幼虫存活的影响*

挑选同日龄的茄二十八星瓢虫1龄和4龄幼虫，饥饿处理6 h后分别放入铺有滤纸、直径30 mm、高13 mm的培养皿中，用湿润棉球保湿，每皿1头试虫，将直径为12 mm的圆形茄子叶片分别于表达ds*HvIAP5*和ds*GFP*的菌液（吸光度$OD_{600\,nm}$均为0.8）中浸泡1 min，风干后置于滤纸上饲喂试虫。每头1龄幼虫饲喂1片经dsRNA处理的叶片，每头4龄幼虫饲喂15片，培养皿置于温度（25±1）℃、光周期14 L∶10 D、相对湿度（80±5）%的人工气候箱中培养，每天更换1次叶片。饲喂1 d后更换用未经处理的新鲜茄子叶片饲喂，每天统计试虫的死亡数量，计算存活率，持续观察10 d。每个龄期设定5个生物学重复，每个重复包含10头幼虫。

1.2.8 *茄二十八星瓢虫细胞凋亡的检测*

取茄二十八星瓢虫4龄初幼虫，分别放入铺有滤纸、直径30 mm、高13 mm的培养皿中，用湿润棉球保湿，每皿1头试虫，分别饲喂1 μL 200 ng/μL的体外合成的ds*HvIAP5*和ds*GFP*，3 d后解剖试虫，取出肠组织，用4%戊二醛溶液对肠组织固定，石蜡包埋，制备4 μm厚的石蜡切片并粘贴到玻片上，进行TUNEL染色处理，使用Pannoramic扫描仪对玻片进行扫描，并利用Case Viewer 2.3软件观察玻片。

1.3 数据分析

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析，采用单因素方差分析，其中两者之间采用*t*检验法进行差异显著性检验；三者及以上应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 茄二十八星瓢虫中*HvIAP5*基因的表达模式

在不同发育阶段的茄二十八星瓢虫体内，*HvIAP5*基因的表达量存在明显差异（$F_{7,16}$=217.0，P<0.001），其中在4龄幼虫中*HvIAP5*基因的相对表达量最高，显著高于其他发育阶段（P<0.05，图1-A）。在茄二十八星瓢虫不同组织中*HvIAP5*基因的相对表达量存在明显差异（$F_{7,16}$=217.0，P<0.001），其中在中肠中*HvIAP5*基因的相对表达量最高，在后肠中次之，而在脂肪体、马氏管、表皮及前肠中相对表达量较低（图1-B）。

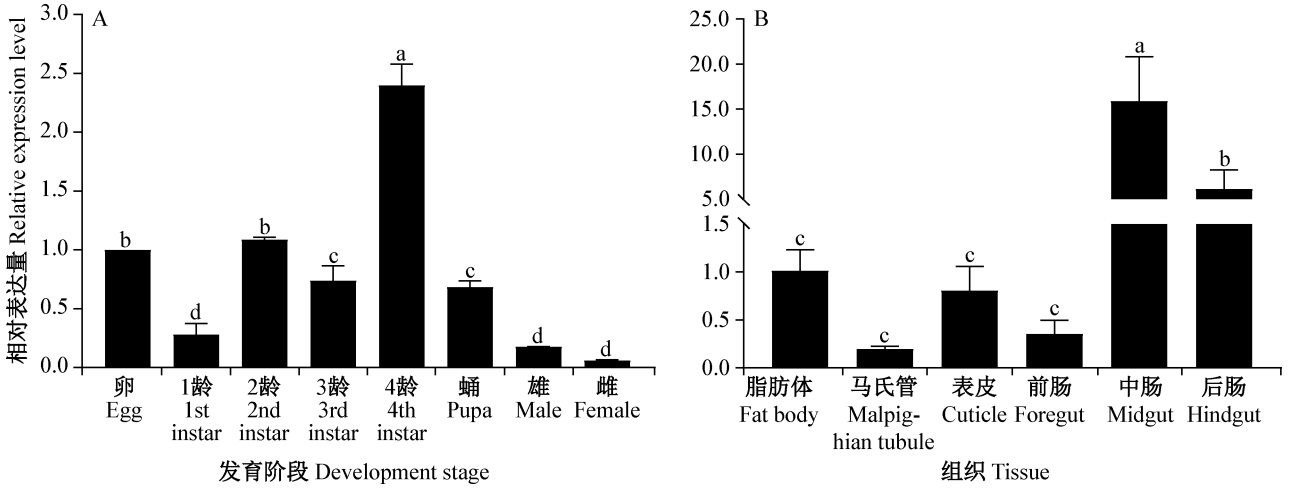

图1 茄二十八星瓢虫不同发育阶段（A）和不同组织（B）中*HvIAP5*基因的表达模式

Fig. 1 Expression profiles of *HvIAP5* at different developmental stages (A) and in different tissues (B) of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著（P<0.05）。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant differences according to Duncan's new multiple range test (P<0.05).

2.2　饲喂体外合成ds*HvIAP5*对幼虫的影响

2.2.1　对1龄幼虫存活率的影响

饲喂300、200和100 ng/μL的ds*HvIAP5* 10 d后，茄二十八星瓢虫的存活率分别为64.0%、30.0%和12.0%，均较对照显著下降（P<0.05），且饲喂ds*HvIAP5*的浓度越高，1龄幼虫的存活率越低（图2-A）。

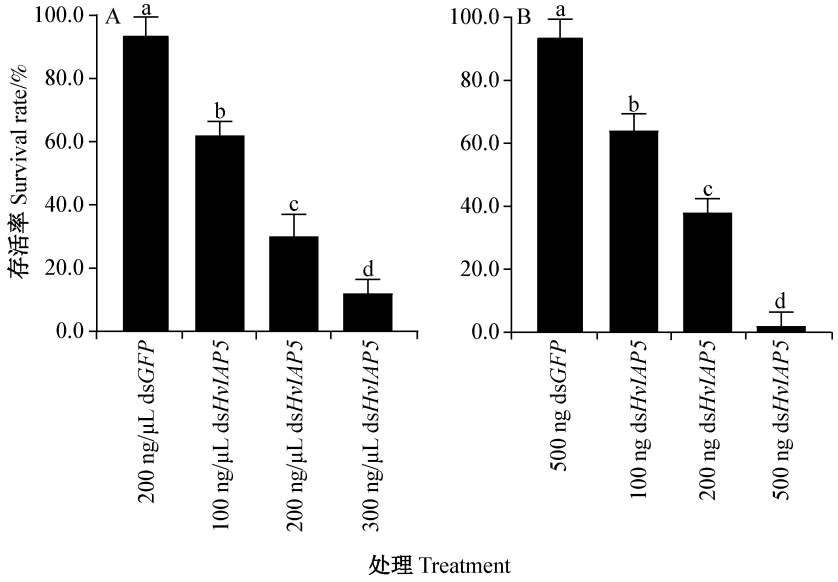

图2　饲喂体外合成ds*HvIAP5*对茄二十八星瓢虫1龄（A）和4龄（B）幼虫存活率的影响

Fig. 2　Effects of feeding *in vitro*-synthesized ds*HvIAP5* on the survival rate of the 1st instar (A) and 4th instar (B) larvae of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著（P<0.05）。Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant differences according to Duncan's new multiple range test (P<0.05).

2.2.2　对4龄幼虫存活率和生长发育的影响

饲喂ds*GFP* 7 d后，茄二十八星瓢虫4龄幼虫可正常化蛹；然后饲喂100 ng ds*HvIAP5*后，个体出现鞘翅和膜翅发育不全、鞘翅畸形和残缺等羽化异常表型；饲喂200 ng ds*HvIAP5*后，个体发育受阻，停滞在预蛹期或化蛹异常；饲喂500 ng ds*HvIAP5* 4 d后，4龄幼虫明显减少或停止摄食，导致发育停滞，无法进入预蛹期（图3）。这些异常个体的体色逐渐变深、干瘪，最终死亡。饲喂1 μL浓度为100、200和500 ng/μL的ds*HvIAP5*后，4龄幼虫的存活率分别为58.0%、32.0%和2.0%，较对照显著降低（图2-B）。

2.3　饲喂体外合成ds*HvIAP5*的干扰效率

饲喂体外合成ds*HvIAP5* 200 ng后2 d，茄二十八星瓢虫4龄幼虫体内*HvIAP5*基因的相对表达量被显著抑制，较对照显著下降了90.8%（t=512.8，df=4，P<0.001，图4）。

2.4　饲喂菌液表达ds*HvIAP5*对幼虫存活率的影响

菌液表达ds*HvIAP5*处理的茄子叶片后第2天，茄二十八星瓢虫1龄幼虫开始死亡，处理10 d后1龄幼虫的存活率为10.0%，极显著低于对照（P<0.001，图5-A）；饲喂菌液表达ds*HvIAP5*处理的茄子叶片后第4天，4龄幼虫开始死亡，虽然40.0%的4龄幼虫能进入化蛹状态，但大多数蛹呈畸形，无法正常羽化而死亡，少数个体能正常羽化且无明显变异；处理10 d后4龄幼虫的存活率为4.0%，极显著低于对照（P<0.001，图5-B）。

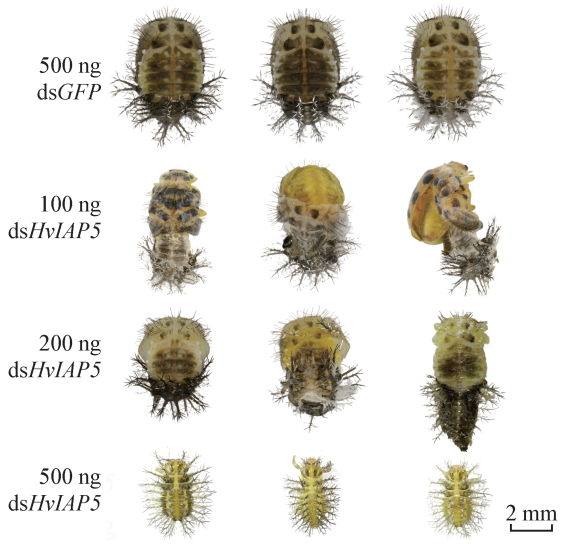

图3　饲喂体外合成ds*HvIAP5*对茄二十八星瓢虫4龄幼虫表型变化的影响

Fig. 3　Effects of feeding *in vitro*-synthesized ds*HvIAP5* on phenotypic changes of the 4th instar larvae of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

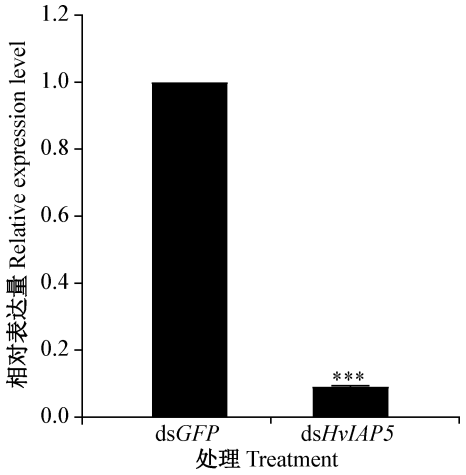

图4 饲喂体外合成ds*HvIAP5*对茄二十八星瓢虫4龄幼虫*HvIAP5*基因相对表达量的影响

Fig. 4 Effects of feeding *in vitro*-synthesized ds*HvIAP5* on the relative expression level of *HvIAP5* in the 4th instar larvae of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

图中数据为平均数±标准误。***表示两个处理之间经*t*检验法检验差异显著(*P*<0.001)。Data are mean±SE. *** indicates significant difference between two treatments according to *t* test (*P*<0.001).

2.5 饲喂体外合成ds*HvIAP5*对幼虫中肠组织的影响

饲喂体外合成ds*GFP*后,茄二十八星瓢虫4龄幼虫中肠组织中未观察到细胞凋亡现象,而饲喂体外合成ds*HvIAP5*后,4龄幼虫中肠组织中细胞有明显的凋亡迹象(图6)。

3 讨论

本研究发现饲喂ds*HvIAP5*能特异性抑制茄二十八星瓢虫中*HvIAP5*基因的表达,且*HvIAP5*基因的沉默显著抑制了幼虫的变态发育进程,导致茄二十八星瓢虫1龄与4龄幼虫的发育速率明显减缓,且存活率较低,初步证实了*HvIAP5*基因在茄二十八星瓢虫的生长发育过程中起关键调控作用,可作为生物防治的潜在分子靶标。

IAP5具有多种功能,在细胞增殖调控和凋亡抑制中均扮演着重要角色。例如,在程序性自噬过程中,埃及伊蚊*Aedes aegypti*中*IAP5*基因具有显著转录活性,在吸血后其表达水平显著上调(Eng et al.,2016);苹果蠹蛾颗粒体病毒(Cydia pomonella granulovirus)中IAP5蛋白能显著增强栗疫菌*Cryphonectria parasitica*中*CpIAP3*的抗凋亡活性(Vilaplana & O'Reilly,2003)。不同昆虫物种及其不同发育阶段中*IAP5*基因的表达模式存在明显差异。Yoon et al.(2020)研究发现赤拟谷盗幼虫末龄期和蛹前期*TcIAP5*基因的表达水平显著升高。本研究结果显示在茄二十八星瓢虫幼虫至成虫的所有发育阶段*HvIAP5*基因均有表达,但其在4龄幼虫期的相对表达量最高,在其他阶段较低。*HvIAP5*基因可能在茄二十八星瓢虫末龄幼虫的生理调控过程中发挥着重要作用,其表达模式可能受蜕皮激素信号通路的调控,并参与幼虫期的营养代谢过程,但这些推测仍需通过基因功能缺失或回补试验以及激素水平检测等手段进行系统验证。此外,*HvIAP5*表达也呈现组织特异性,其在中肠中相对表达量最高,在后肠中次之,在其他组织中表达量较低;植食性昆虫取食后,植物防御物质如蛋白酶抑制剂等可能在其中肠中发挥作用,而昆虫的IAP家族可能参与抵御病原体侵袭或修复肠上皮细胞损伤,进而发挥维持肠道屏障完整性的功能(Pedersen et al.,2014)。

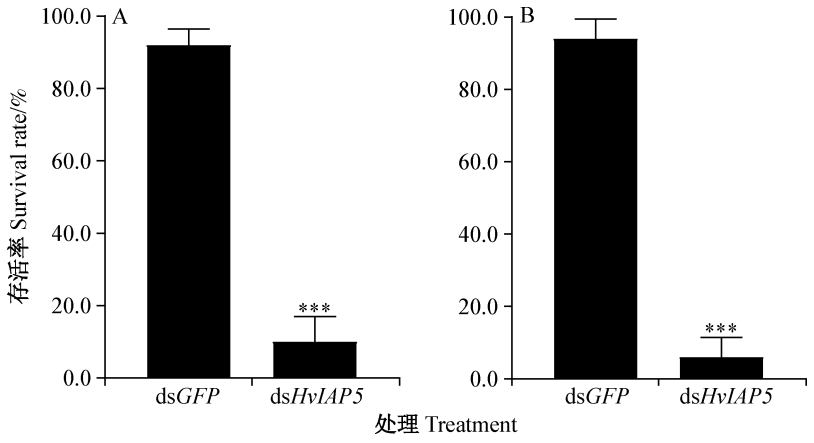

图5 饲喂菌液表达ds*HvIAP5*对茄二十八星瓢虫1龄(A)和4龄(B)幼虫存活率的影响

Fig. 5 Effects of bacterial-expressed ds*HvIAP5* on the survival rate of the 1st instar (A) and 4th instar (B) larvae of *Henosepilachna vigintioctopunctata*

图中数据为平均数±标准误。***表示经*t*检验法检验差异显著(*P*<0.001)。Data are mean±SE. *** indicates significant difference according to *t* test (*P*<0.001).

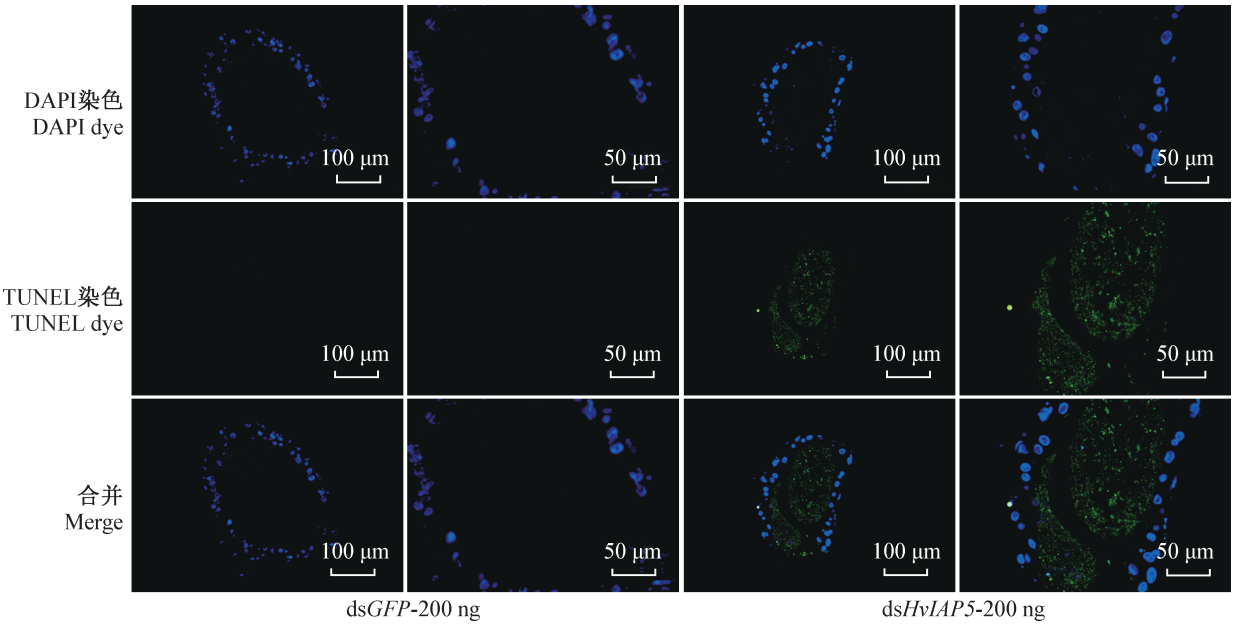

图6　饲喂体外合成ds*HvIAP5*后茄二十八星瓢虫4龄幼虫肠道TUNEL染色观察

Fig. 6　TUNEL staining assay of the midgut in the 4th instar larvae of *Henosepilachna vigintioctopunctata* fed with *in vitro*-synthesized ds*HvIAP5*

近20年来，RNAi技术因其高度的特异性和高效性，在昆虫抗药性机制解析、致死靶基因筛选鉴定等领域发挥了重要作用（Zotti et al.，2018；Lü et al.，2020）。例如，通过RNAi技术明确球孢白僵菌*Beauveria bassiana*侵染后黏虫*Mythimna separata*体内2个*MsSerpin*基因具有免疫反应（张春雨等，2024）；Argonaute基因家族可显著影响二化螟*Chilo suppressalis* RNAi的效率（张伟等，2025）。本研究结果显示饲喂ds*HvIAP5*后茄二十八星瓢虫的生长发育停滞，蜕皮异常或化蛹失败，最终导致其死亡；通过肠道TUNEL染色发现，ds*HvIAP5*处理显著促进了幼虫中肠组织的细胞凋亡，抑制了细胞正常增殖；推测沉默*HvIAP5*基因后，中肠组织的细胞凋亡水平显著增加，导致中肠完整性受损，进而影响幼虫取食行为和消化代谢能力。饲喂体外合成ds*HvIAP5* 2 d后，茄二十八星瓢虫中*HvIAP5*基因的表达量明显降低，且在第10天的死亡率呈明显的剂量效应。在饲喂ds*HvCHS1*（骆旭铭等，2022）、ds*HvCOPI*（Lü et al.，2021）及ds*HvvATPase A*和ds*HvvATPase E*（Guo et al.，2021）过程中也观察到类似的剂量依赖效应，进一步证实了dsRNA剂量与靶标基因沉默效率之间存在显著正相关性。

近年来，基于细菌表达系统生成dsRNA已成为一种高效且低成本的制备方法，显著降低了RNAi技术的应用成本，同时为开发可持续的害虫管理策略提供了新思路。本研究发现饲喂细菌表达的ds*HvIAP5*可高效诱导茄二十八星瓢虫的RNAi效应，显著降低幼虫存活率，其中1龄幼虫的存活率为10.0%，4龄幼虫的存活率仅有4.0%，比体外合成的ds*HvIAP5*效果更好。同样，Lü et al.（2020）研究结果也显示，与体外合成的ds*HvRPS18*和ds*HvRPL13*相比，饲喂细菌表达的ds*HvRPS18*和ds*HvRPL13*可显著增加茄二十八星瓢虫的死亡率。究其原因可能是，大肠杆菌通过激活宿主免疫系统间接导致害虫适应性代价显著增加（Yao et al.，2015）；虫体肠道内存在的dsRNase可能对外源裸露的dsRNA产生降解作用，而大肠杆菌通过其细胞壁结构对dsRNA形成物理屏障，从而有效避免dsRNase的降解；此外，昆虫肠道内的共生微生物群分解大肠杆菌的细胞壁，并释放其中的dsRNA，发挥其毒性效应（Salem et al.，2017）。

本研究首次明确了*HvIAP5*基因的功能，并通过RNAi证实*HvIAP5*的沉默显著影响幼虫存活和发育，表明*HvIAP5*是潜在的RNAi高效靶标基因。这一发现为基于RNAi技术的茄二十八星瓢虫防治提供了新靶标；此外，细菌表达的dsRNA在基因沉默效率上显著高于体外合成的dsRNA，但二者差异的分子机制尚不明确，后续可通过比较分析dsRNA的稳定性、结构完整性以及细胞摄取效率等关键参数来揭示其潜在作用机理。目前尚不清楚*HvIAP5*的

沉默是否会引起其他信号通路如免疫相关通路或蜕皮激素信号通路中基因表达的级联变化，后续可通过全基因组转录组分析及后续功能验证试验予以阐明。

参 考 文 献（References）

Albadari N, Li W. 2023. Survivin small molecules inhibitors: recent advances and challenges. Molecules, 28(3): 1376

Altieri DC. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. Nature Reviews Cancer, 3(1): 46−54

Eng MW, van Zuylen MN, Severson DW. 2016. Apoptosis-related genes control autophagy and influence DENV-2 infection in the mosquito vector, *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 76: 70−83

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 391(6669): 806−811

Guo W, Guo MJ, Yang CX, Liu ZQ, Chen SM, Lü J, Qiu BL, Zhang YJ, Zhou XG, Pan HP. 2021. RNA interference-mediated silencing of *vATPase* subunits *A* and *E* affect survival and development of the 28-spotted ladybeetle, *Henosepilachna vigintioctopunctata*. Insect Science, 28(6): 1664−1676

He HJ, Hou L, Wang JX, Zhao XF. 2012. The apoptosis inhibitor survivin prevents insect midgut from cell death during postembryonic development. Molecular Biology Reports, 39(2): 1691−1699

He WW, Xu WB, Xu SJ, Lu H, Zhang J. 2019. Expressing dsRNA in bacteria against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. Journal of Plant Protection, 46(6): 1379−1380 (in Chinese) [何弯弯, 许文博, 徐世静, 卢欢, 张江. 2019. 细菌表达dsRNA抗马铃薯甲虫. 植物保护学报, 46(6): 1379−1380]

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer, 26(4): 239−257

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods, 25(4): 402−408

Lü J, Chen SM, Guo MJ, Ye CY, Qiu BL, Wu JH, Yang CX, Pan HP. 2018. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis of the ladybird beetle *Henosepilachna vigintioctomaculata*. Frontiers in Physiology, 9: 1614

Lü J, Guo W, Chen SM, Guo MJ, Qiu BL, Yang CX, Zhang YJ, Pan HP. 2020. Double-stranded RNAs targeting *HvRPS18* and *HvRPL13* reveal potential targets for pest management of the 28-spotted ladybeetle, *Henosepilachna vigintioctopunctata*. Pest Management Science, 76(8): 2663−2673

Lü J, Yang CX, Liu ZQ, Vélez AM, Guo MJ, Chen SM, Qiu BL, Zhang YJ, Zhou XG, Pan HP. 2021. Dietary RNAi toxicity assay suggests α and γ subunits of *HvCOPI* as novel molecular targets for *Henosepilachna vigintioctopunctata*, an emerging coccinellid pest. Journal of Pest Science, 94(4): 1473−1486

Luo XM, Chen SM, Pan G, Yang CX, Pan HP. 2022. Silencing of chitin synthase 1 (*HvCHS1*) by dietary RNAi inhibits the survival and development of the 28-spotted potato ladybird, *Henosepilachna vigintioctopunctata*. Chinese Journal of Biological Control, 38(5): 1083−1093 (in Chinese) [骆旭铭, 陈诗敏, 潘广, 杨春晓, 潘慧鹏. 2022. 饲喂法RNAi介导的*HvCHS1*基因沉默抑制茄二十八星瓢虫的存活和发育. 中国生物防治学报, 38(5): 1083−1093]

Pedersen J, LaCasse EC, Seidelin JB, Coskun M, Nielsen OH. 2014. Inhibitors of apoptosis (IAPs) regulate intestinal immunity and inflammatory bowel disease (IBD) inflammation. Trends in Molecular Medicine, 20(11): 652−665

Saleem M, Qadir MI, Perveen N, Ahmad B, Saleem U, Irshad T, Ahmad B. 2013. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. Chemical Biology & Drug Design, 82(3): 243−251

Salem H, Bauer E, Kirsch R, Berasategui A, Cripps M, Weiss B, Koga R, Fukumori K, Vogel H, Fukatsu T, et al. 2017. Drastic genome reduction in an herbivore's pectinolytic symbiont. Cell, 171(7): 1520−1531

Srinivasula SM, Ashwell JD. 2008. IAPs: what's in a name? Molecular Cell, 30(2): 123−135

Vilaplana L, O'Reilly DR. 2003. Functional interaction between *Cydia pomonella* granulovirus IAP proteins. Virus Research, 92(1): 107−111

Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, Dixit VM. 2000. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. Current Biology, 10(21): 1359−1366

Wang YJ, Liu ZQ, Li HL, Pan HP, Yang CX. 2022. The effects of silencing of *HvFTZ-F1 via* RNAi on the survival and development of the 28-spotted potato ladybird, *Henosepilachna vigintioctopunctata* larvae. Chinese Journal of Biological Control, 38(5): 1075−1082 (in Chinese) [王亚洁, 刘卓琦, 李华丽, 潘慧鹏, 杨春晓. 2022. RNAi沉默*HvFTZ-F1*对茄二十八星瓢虫幼虫存活及发育的影响. 中国生物防治学报, 38(5): 1075−1082]

Wang YJ, Liu ZQ, Pan G, Qiu BL, Pan HP, Yang CX. 2023. RNAi-mediated silencing of *HvCDA1* affects the survival and development of the 28-spotted ladybeetle, *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Acta Entomologica Sinica, 66(1): 27−36 (in Chinese) [王亚洁, 刘卓琦, 潘广, 邱宝利, 潘慧鹏, 杨春晓. 2023. RNAi介导的*HvCDA1*基因沉默影响茄二十八星瓢虫存活和发育. 昆虫学报, 66(1): 27−36]

Wang ZL. 2019. Effects of macronutrient on the development of *Henosepilachna vigintioctopunctata* larvae. Master thesis. Jing-

zhou: Yangtze University (in Chinese) [王在凌. 2019. 基础营养对茄二十八星瓢虫幼虫发育的影响. 荆州: 长江大学]

Yao ZC, Wang AL, Li YS, Cai ZH, Lemaitre B, Zhang HY. 2015. The dual oxidase gene *BdDuox* regulates the intestinal bacterial community homeostasis of *Bactrocera dorsalis*. ISME Journal, 10(5): 1037−1050

Yoon JS, Koo J, George S, Palli SR. 2020. Evaluation of inhibitor of apoptosis genes as targets for RNAi-mediated control of insect pests. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 104(4): e21689

Zhang CY, Yang HJ, Hu YS, Wang YX, Fan D. 2024. Cloning of the serine protease inhibitor from oriental armyworm *Mythimna separata* and analysis of its anti-*Beauveria bassiana* function. Journal of Plant Protection, 51(1): 28−38 (in Chinese) [张春雨, 杨洪佳, 胡育硕, 王艺晓, 樊东. 2024. 黏虫丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆及抗球孢白僵菌功能分析. 植物保护学报, 51(1): 28−38]

Zhang JZ, Chai L, Shi XK, Gao L, Fan YH. 2021. RNA interference technology and pest control. Journal of Shanxi University (Natural Science Edition), 44(5): 980−987 (in Chinese) [张建珍, 柴林, 史学凯, 高璐, 范云鹤. 2021. RNA干扰技术与害虫防治. 山西大学学报(自然科学版), 44(5): 980−987]

Zhang W, Li SH, Jin HH, Yao ZT, Ma WH, Li CY. 2025. The Argonaute gene family affects the RNA interference efficiency in Asiatic rice borer *Chilo suppressalis*. Journal of Plant Protection, *52(2)*: 456−467 (in Chinese) [张伟, 李诗慧, 金慧慧, 姚焯天, 马伟华, 李昌焱. 2025. Argonaute基因家族对二化螟RNA干扰效率的影响. 植物保护学报, 52(2): 456−467]

Zong SX, Li T, Huang Q, Cheng BP, Zhao HW. 2023. Screening and analysis of the pivotal RNAi target genes for the control of pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. Journal of Plant Protection, 50(5): 1280−1288 (in Chinese) [宗诗轩, 李涛, 黄清, 程保平, 赵弘巍. 2023. 豌豆蚜防控的关键RNAi靶标基因筛选与分析. 植物保护学报, 50(5): 1280−1288]

Zotti M, dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT, Smagghe G. 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. Pest Management Science, 74(6): 1239−1250

（责任编辑：张俊芳）